

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 6月30日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-188895  
Application Number:

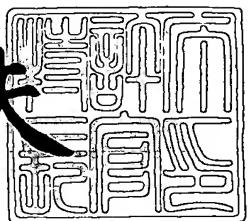
[ST. 10/C] : [JP2003-188895]

出願人 シスメックス株式会社  
Applicant(s):

2003年 7月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3055020

【書類名】 特許願

【整理番号】 02-028JP1

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスマックス  
株式会社内

【氏名】 川手 康徳

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスマックス株式会社

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-219187

【出願日】 平成14年 7月29日

【代理人】

【識別番号】 100088867

【弁理士】

【氏名又は名称】 西野 卓嗣

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059617

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9723350

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液分析装置及び方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血液検体に所定の試薬を添加して測定用試料を調製する試料

調製部と、

測定用試料に光を照射し、測定用試料中の粒子から発せられた光学的情報を検出する光検出部と、

光検出部が検出した光学的情報に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置。

【請求項 2】 前記所定の試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原を含む、請求項 1 に記載の血液分析装置。

【請求項 3】 前記所定の試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子を含む、請求項 1 に記載の血液分析装置。

【請求項 4】 前記所定の試薬は、血球を染色するための蛍光色素を含む、請求項 1 に記載の血液分析装置。

【請求項 5】 担体粒子から検出される光学的情報は、血球から検出される光学的情報と差異を有する、請求項 3 に記載の血液分析装置。

【請求項 6】 前記解析部は、前記担体粒子から検出される光学的情報と血球から検出される光学的情報との差異に基づき、担体粒子と血球を分類する、請求項 3 に記載の血液分析装置。

【請求項 7】 前記解析部は、血球を赤血球、白血球、血小板に分類して計数する、請求項 1 に記載の血液分析装置。

【請求項 8】 前記解析部は、担体粒子から検出される光学的情報に基づき、担体粒子の凝集度を求め、免疫測定対象物質の検出を行う請求項 3 に記載の血液分析装置。

【請求項 9】 前記解析部は、血球計数測定の結果に基づき、免疫測定の結果を補正する、請求項 1 に記載の血液分析装置。

【請求項 10】 前記解析部は、血球の大きさ情報に基づいてヘマトクリット値を求め、そのヘマトクリット値を用いて免疫測定の結果を補正する、請求項

9に記載の血液分析装置。

【請求項11】 前記光検出部は、光学的情報として、光を照射された粒子が発する散乱光を検出する、請求項1に記載の血液分析装置。

【請求項12】 前記光検出部は、光学的情報として、光を照射された粒子が発する蛍光を検出する、請求項1に記載の血液分析装置。

【請求項13】 血液検体に所定の試薬を添加して測定用試料を調製する工程と、

測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、  
検出された光学的情報に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う工程と、を有する、血液分析方法。

【請求項14】 少なくとも二つに分けた血液検体の一方に、所定の免疫測定用試薬を添加して免疫測定用試料を調製し、前記少なくとも二つに分けた血液検体の他方に、所定の血球計数測定用試薬を添加して血球計数測定用試料を調製する試料調製部と、

前記免疫測定用試料及び前記血球計数測定用試料の各試料に光を照射し、各試料中の粒子から発せられた光学的情報を検出する光検出部と、

前記免疫測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき免疫測定対象物質を検出し、前記血球計数測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき血球計数を行う解析部と、を有する血液分析装置。

【請求項15】 前記免疫測定用試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原を含む、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項16】 前記免疫測定用試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子を含む、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項17】 前記血球計数測定用試薬は、血球を染色するための蛍光色素を含む、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項18】 担体粒子から検出される光学的情報は、血球から検出される光学的情報と差異を有する、請求項16に記載の血液分析装置。

【請求項19】 前記解析部は、前記担体粒子から検出される光学的情報と血球から検出される光学的情報との差異に基づき、担体粒子と血球を分類する、

請求項16に記載の血液分析装置。

【請求項20】 前記解析部は、血球を赤血球、白血球、血小板に分類して計数する、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項21】 前記解析部は、担体粒子から検出される光学的情報に基づき、担体粒子の凝集度を求め、免疫測定対象物質の検出を行う、請求項16に記載の血液分析装置。

【請求項22】 前記解析部は、血球計数測定の結果に基づき、免疫測定の結果を補正する、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項23】 前記解析部は、血球の大きさ情報に基づいてヘマトクリット値を求め、そのヘマトクリット値を用いて免疫測定の結果を補正する、請求項22に記載の血液分析装置。

【請求項24】 前記光検出部は、光学的情報として、光を照射された粒子が発する散乱光を検出する、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項25】 前記光検出部は、光学的情報として、光を照射された粒子が発する蛍光を検出する、請求項14に記載の血液分析装置。

【請求項26】 少なくとも二つに分けた血液検体の一方に、所定の免疫測定用試薬を添加して免疫測定用試料を調製する工程と、

前記少なくとも二つに分けた血液検体の他方に、所定の血球計数測定用試薬を添加して血球計数測定用試料を調製する工程と、

前記免疫測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、

前記血球計数測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、

前記免疫測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき免疫測定対象物質の検出を行う工程と、

前記血球計数測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき血球計数を行う工程と、を有する血液分析方法。

【請求項27】 血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する試料調製部と、

測定用試料を流すためのフローセルと、フローセル中を流れる測定用試料に光

を照射するための光源と、光を照射された測定用試料中の粒子から発せられた前方散乱光及び蛍光を検出する検出器と、を有する光検出部と、

光検出部が検出した前方散乱光及び蛍光に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置。

【請求項 28】 血液検体に、所定の試薬を添加して、測定用試料を調製する試料調製部と、

測定用試料中の粒子が有する物理的特性を検出する検出部と、

検出部が検出した物理的特性に基づき血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置。

【請求項 29】 前記所定の試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原を含む、請求項 28 に記載の血液分析装置。

【請求項 30】 前記所定の試薬は、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子を含む、請求項 28 に記載の血液分析装置。

【請求項 31】 前記所定の試薬は、血球を染色するための蛍光色素を含む、請求項 28 に記載の血液分析装置。

【請求項 32】 前記検出部は、粒子が有する物理的特性として、粒子が細孔を通過するときに生じる電気抵抗を検出する、請求項 28 に記載の血液分析装置。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、血球計数測定と免疫測定を、一つの検体に対し効率的に行うための血液分析装置及び方法に関する。

#### 【0002】

#### 【従来の技術】

臨床検査の分野においては、血球計数装置、免疫測定装置、血液凝固測定装置、生化学装置、その他各種分析装置が測定項目に応じて用いられている。そのため複数の分析装置を管理する必要がある。そして各分析装置に応じて患者から検体を採取する必要があり、患者にとっては負担となる。そこで、一つの検体から

より多くの項目を測定できる多項目自動分析装置が提供されている。

#### 【0003】

##### 血球計数測定

血球計数測定とは、血液（全血）中に含まれる血球を分類し、血球を種類毎にを計数することである。血球は一般的に赤血球、白血球、血小板などに分類され、血球計数の項目としては赤血球数、白血球数、血小板数が代表的である。その他、赤血球として未成熟な状態で末梢血中に出現した網状赤血球などが分類され計数されることもある。

#### 【0004】

血球計数測定を行う分析装置としては、自動血球分析装置XE-2100（シスメックス株式会社製）がある。これは、血球を所定の蛍光色素で染色し、各血球から前方散乱光、側方散乱光や蛍光といった光学的情報をフローサイトメトリ法により検出し、これらの光学的情報を組み合わせて血球を分類して計数するものである。またこの装置は網状赤血球測定機能を有する。この機能では、溶血させることなく染色液と反応させて蛍光染色を施した血球から、前方散乱光強度と側方蛍光強度を検出し、それらをパラメータとした二次元スキャッタグラムを作成して血球を血小板、赤血球、網状赤血球などに分類する。血球を蛍光染色するための染色液は、各血球中に含まれる核酸を染色する色素を含んでおり、白血球や網状赤血球が染色される。血球から検出される側方蛍光強度は、血球中の核酸量を反映する情報となり、前方散乱光強度（大きさ情報）と側方蛍光強度（核酸量情報）を組み合わせることにより血球を分類することができる。

#### 【0005】

血球計数測定の項目には、血球数だけではなく、平均赤血球容積（M C V）やヘマトクリット値といった項目も用いられる。M C Vとは、全血中の赤血球の大きさの平均値である。ヘマトクリット値とは、全血中に占める血球成分の容積比率である。血球成分容積の大部分は赤血球容積が占めるため、全血中の赤血球数とM C Vを求め、M C Vに全血中の赤血球数を乗じ、それを全血の体積で除することにより、ヘマトクリット値が算出される。

#### 【0006】

## 免疫測定

免疫測定とは、血液などの検体中に含まれる抗原又は抗体を測定対象物質とし、それらを抗原抗体反応を利用して検出する測定方法である。代表的なものとして、酵素免疫測定（EIA）法、ラジオイムノアッセイ（RIA）法、粒子凝集法などがある。粒子凝集法は、測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子を試料と混和し、抗原抗体反応による粒子凝集反応を生じさせ、その粒子凝集の度合い（凝集度）を吸光度変化や光散乱変化などから測定し、免疫測定対象物質を検出する方法である。

### 【0007】

粒子凝集法においては、凝集反応後の担体粒子を含む試料をフローサイトメトリ法にて測定し、各粒子から得られた光学的情報に基づき凝集度を求める方法が知られている。光学的情報として、担体粒子の大きさを反映する情報、例えば前方散乱光を用いれば、未凝集の担体粒子や凝集した担体粒子の識別ができる、担体粒子の凝集度を求めることができる。この凝集度としては例えば、特許文献1に開示された凝集率がある。これはフローサイトメータで粒子それぞれの散乱光強度を求め、それぞれの散乱光強度によって、未凝集の単独粒子と、複数の担体粒子が凝集して生じた凝集粒子とを分類して、単独粒子数（M）と凝集粒子数（P）を計数し、MとPの合計である総粒子数（T）を得、P/Tを凝集率として算出する方法である。この方法では2個の担体粒子が凝集した段階で反応を捉えることができるため、非常に高感度な免疫測定が可能となる。この凝集度測定は免疫測定対象物質の測定濃度範囲に応じて、各種の方法、例えば一定数以上凝集した粒子の度合いを測定する方法などを用いることができる。上記特許文献1の凝集度測定方法は、シスメックス株式会社製の免疫凝集測定装置PAMIAシリーズに用いられている。

### 【0008】

これら血球計数用の分析装置や免疫測定用の分析装置などでは、全血や血清、血漿などを試料とするが、そのうち、血球計数装置では全血試料を用いる必要があり、免疫測定など他の装置では試料として血清又は血漿が用いられることが多いため、分析装置の共通化がなされていなかった。特許文献2には血球計数と免

疫測定を行うことができる全血血球免疫測定装置が開示されている。この装置は、血球計数測定部と免疫測定部を備え、全血試料を血球計数測定部と免疫測定部にそれぞれ分注して測定する装置である。その免疫測定部では全血試料を溶血剤により溶血させ、ラテックス試薬を用いて免疫測定を行う。

### 【0009】

#### 【特許文献1】

特公平6-19349号公報

#### 【特許文献2】

米国特許第6106778号明細書

### 【0010】

#### 【発明が解決しようとする課題】

しかし血球計数測定と免疫測定の両者を行う場合、患者から採取する検体量を少なくし、一台の小型の分析装置で測定するためには、同一の測定部で血球計数測定と免疫測定を行うことが望まれている。

### 【0011】

#### 【課題を解決するための手段】

上記の課題に鑑み本発明は、血液検体に所定の試薬を添加して測定用試料を調製する試料調製部と、測定用試料に光を照射し、測定用試料中の粒子から発せられた光学的情報を検出する光検出部と、光検出部が検出した光学的情報に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置を提供する。

### 【0012】

また本発明は、血液検体に所定の試薬を添加して測定用試料を調製する工程と、測定用試料中の粒子から光学的情情報を検出する工程と、検出された光学的情報に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う工程と、を有する、血液分析方法を提供する。

### 【0013】

また本発明は、少なくとも二つに分けた血液検体の一方に、所定の免疫測定用試薬を添加して免疫測定用試料を調製し、前記少なくとも二つに分けた血液検体

の他方に、所定の血球計数測定用試薬を添加して血球計数測定用試料を調製する試料調製部と、前記免疫測定用試料及び前記血球計数測定用試料の各試料に光を照射し、各試料中の粒子から発せられた光学的情報を検出する光検出部と、前記免疫測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき免疫測定対象物質を検出し、前記血球計数測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき血球計数を行う解析部と、を有する血液分析装置を提供する。

#### 【0014】

また本発明は、少なくとも二つに分けた血液検体の一方に、所定の免疫測定用試薬を添加して免疫測定用試料を調製する工程と、前記少なくとも二つに分けた血液検体の他方に、所定の血球計数測定用試薬を添加して血球計数測定用試料を調製する工程と、前記免疫測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、前記血球計数測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、前記免疫測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき免疫測定対象物質の検出を行う工程と、前記血球計数測定用試料中の粒子から検出された光学的情報に基づき血球計数を行う工程と、を有する血液分析方法を提供する。

#### 【0015】

また本発明は、血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する試料調製部と、測定用試料を流すためのフローセルと、フローセル中を流れる測定用試料に光を照射するための光源と、光を照射された測定用試料中の粒子から発せられた前方散乱光及び蛍光を検出する検出器と、を有する光検出部と、光検出部が検出した前方散乱光及び蛍光に基づき、血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置を提供する。

#### 【0016】

また本発明は、血液検体に、所定の試薬を添加して、測定用試料を調製する試料調製部と、測定用試料中の粒子が有する物理的特性を検出する検出部と、検出部が検出した物理的特性に基づき血球計数と免疫測定対象物質の検出を行う解析部と、を有する血液分析装置を提供する。

#### 【0017】

### 【発明の実施の形態】

以下、本発明にかかる血液分析装置の概略及び測定原理につき説明する。この血液分析装置では、血球計数測定と、粒子凝集法による免疫測定と、を同一試料に対して同時に行う。血球及び担体粒子を含む試料から、フローサイトメトリ法を用い、各粒子の特徴を反映する光学的情報として前方散乱光や側方蛍光を検出する。そしてそれらの光学的情報をパラメータとした二次元スキャッタグラム（以下、単に「スキャッタグラム」という）を作成する。スキャッタグラム上に出現した各粒子に対応するプロットを、出現位置に応じて血球や担体粒子の種類毎に分類し、計数する。担体粒子については前記検出した光学的情報に基づき凝集度を求める。

#### 【0018】

図1は、この血液分析装置の構成を示す図である。血液分析装置1は、試料調製部11、光検出部12、解析部13、出力部14からなる。

#### 【0019】

試料調製部11は、検体に担体粒子や希釈液、染色液など所定の試薬を添加して反応させ、測定用試料を調製するためのものである。試料調製部11では検体中の血球に蛍光染色が施されるとともに、免疫測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子が添加され、粒子凝集反応を行わせる。担体粒子には、粒子凝集法で一般的に用いられているもの、例えばポリスチレン等のラテックス粒子、磁性粒子、ガラス粒子、デンドリマーなどを用いることができる。担体粒子に感作する抗原又は抗体には、免疫測定対象物質が抗体であれば該抗体と特異的に抗原抗体反応する抗原が用いられ、免疫測定対象物質が抗原であれば該抗原と特異的に抗原抗体反応する抗体が用いられる。例えば測定項目がCEA抗原（癌胎児性抗原）であれば抗CEA抗体が感作され、測定項目が抗HBs抗体であればHBs抗原が感作される。

#### 【0020】

試料調製部11で調製された測定用試料は、光検出部12へ送液される。光検出部12はフローサイトメトリ法によって試料中の粒子から側方蛍光や前方散乱光を検出するものである。試料調製部11にて調製された測定用試料は、光検出

部 12 のフローセル 12 a に流されて試料流を形成する。レーザ光源 12 b からはレーザ光が発せられ、フローセル 12 a の試料流を照射する。そして試料流中の粒子がレーザ光の照射領域を横切る際に生じる側方蛍光がフォトマルチプライヤチューブ 12 c に、前方散乱光はフォトダイオード 12 d によってそれぞれ受光・光電変換されて電気信号となる。

#### 【0021】

光検出部 12 により検出された側方蛍光・前方散乱光の電気信号は解析部 13 へ送られる。解析部 13 はハードディスク、CPU、ROM、RAM などからなるコンピュータにより構成される。解析部 13 では、光検出部 12 によって検出された電気信号を処理し、各粒子の信号毎に側方蛍光強度・前方散乱光強度を得る。そして側方蛍光強度・前方散乱光強度をパラメータとしたスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上に出現した粒子をその出現位置に応じて各種血球・担体粒子に分類し、計数する。

#### 【0022】

前方散乱光強度は粒子の大きさを反映するものであるので、粒子の種類毎に大きさが異なる場合には前方散乱光強度のみを用いて粒子を分類することができる。血球（血小板・赤血球・白血球）のうち、血小板が最も小さく、白血球が最も大きい。しかしこれらの血球の大きさは明確に分かれるものではなく、異なった種類同士で互いに大きさの重なるものがあるので、前方散乱光強度による大きさ情報だけでは正確に分類することが難しい。そこで、各粒子の大きさ以外の特徴を反映する光学的情報として側方蛍光強度をさらに検出する。血球中に含まれる核酸を染色する色素により予め蛍光染色を施しておけば、血球から検出される側方蛍光強度は、血球中の核酸量を反映する情報となり、前方散乱光強度（大きさ情報）と側方蛍光強度（核酸量情報）を組み合わせることにより血球をより正確に分類することができる。

#### 【0023】

血球計数測定と免疫測定を同時に行うため、免疫測定に用いる担体粒子は、スキャッタグラム上で血球の出現位置と重なることのないような性質のものを用いる。例えば担体粒子の大きさを変えることによって前方散乱光強度が調整される

。また担体粒子に蛍光色素を含有させたり、含有させる蛍光色素の濃度を変えることにより、側方蛍光強度が調整される。このようにして、担体粒子が二次元スキャッタグラム上で血球と明確に異なる位置に出現するようすれば、血球と担体粒子の分類が可能となる。担体粒子として、血球よりも充分小さなものの、あるいは血球よりも充分大きいものを用いれば、前方散乱光強度の違いによって試料中の粒子を担体粒子と血球とに分類することが可能である。血球と同程度の大きさの担体粒子を用いる場合は、前方散乱光強度と蛍光強度を組み合わせることにより、担体粒子と血球とを分類することができる。

#### 【0024】

スキャッタグラム上で血球と分類された担体粒子については、凝集度を求め免疫測定対象物質を検出する。凝集度としては、担体粒子の前方散乱光強度に基づき前記特公平6-19349に開示された凝集率を用いる。この凝集率は、以下のようにして求める。まずフローサイトメータで粒子それぞれの散乱光強度を求め、それぞれの散乱光強度によって、未凝集の単独粒子と、複数の担体粒子が凝集して生じた凝集粒子とを分類して、単独粒子数(M)と凝集粒子数(P)を計数し、MとPの合計である総粒子数(T)を得、P/Tを凝集率として算出する。

#### 【0025】

担体粒子の凝集率は、既知濃度の免疫測定対象物質を含む検体を測定して予め作成した検量線に基づき、濃度換算される。このようにして、未知検体中に含まれる免疫測定対象物質の濃度が得られる。

#### 【0026】

図2に、本血液分析装置による測定例であるスキャッタグラムを示す。全血検体に、担体粒子として蛍光色素を含有させた蛍光ラテックス粒子と、血球を染色するための所定の蛍光色素とを混合することにより調製された試料から検出した前方散乱光及び側方蛍光に基づき作成されたスキャッタグラムであり、前方散乱光強度を縦軸に、側方蛍光強度を縦軸にとっている。担体粒子は、未凝集の単独粒子21、二個の担体粒子が凝集して生じた二個凝集粒子22、三個の担体粒子が凝集して生じた三個凝集粒子23というように、凝集の仕方によって前方散乱光強度が異なり、それぞれの集団に分離して出現する。血球として、血小板24

、赤血球25が出現するが、いずれも前方散乱光強度と側方蛍光強度の違いから、担体粒子と分類することができる。

#### 【0027】

図2においてG1は、担体粒子が出現する領域として予め設定されているものである。領域G1内に出現している担体粒子の粒度分布の例を、図3のヒストグラムに示す。縦軸に粒子の個数（度数）を、横軸に前方散乱光強度をとっている。前方散乱光強度について閾値を設定することにより、凝集粒子と単独粒子を分類する。

#### 【0028】

分類された単独粒子の粒子数Mと凝集粒子の粒子数P（Pは二個以上凝集している粒子数の合計）から、総粒子数Tを得て、凝集率P/Tを算出し、予め作成した検量線に基づき濃度換算することで、各免疫測定項目の抗原（抗体）濃度を得ることができる。

#### 【0029】

血球は、前方散乱光強度と側方蛍光強度の違いから、その種類毎の集団となってスキャッタグラム上に出現する。そこで各種類の血球につき、出現すると目される領域を予めスキャッタグラム上に設定し、各領域内の粒子数を計数することで、血球の計数を行う。図2中、領域G2は血小板、領域G3は赤血球をそれぞれ分類するためのものである。

#### 【0030】

担体粒子の粒子径や含有する蛍光色素の濃度、あるいは血球を染色する蛍光色素の濃度などを適宜調整し、スキャッタグラム上で担体粒子と血球の出現位置が異なるようにすれば、血球と担体粒子を明確に分類できる。また、免疫測定を複数項目にわたって行う場合には、第一の測定項目に対応する抗体又は抗原を感作した第一の担体粒子と、第二の測定項目に対応する抗体又は抗原を感作した第二の担体粒子を用意すればよい。このとき第一・第二それぞれの担体粒子が含有する蛍光色素の濃度を変えるなどすることで、第一の担体粒子と第二の担体粒子をスキャッタグラム上で分類することができる。

#### 【0031】

図4は、免疫測定を同時に2項目行なう場合のスキャッタグラムの例であり、領域G1に出現する担体粒子（第一の担体粒子）より高濃度の蛍光色素を含有する第二の担体粒子が出現している。第二の担体粒子は、第一の担体粒子と同様に未凝集の単独粒子31、二個の担体粒子が凝集して生じた二個凝集粒子32、三個の担体粒子が凝集して生じた三個凝集粒子33というように、凝集の仕方によってそれぞれの集団に分離して出現している。そして第一の担体粒子を含む領域G1、第二の担体粒子を含む領域G4各々で、領域内の粒度分布から凝集率を求め、第一・第二それぞれの項目の免疫測定を行うことができる。

#### 【0032】

出力部14には、CRTやLCDといった表示装置やプリンタが用いられる。解析部13にて算出された免疫測定の結果や各種血球数、解析の際に作成されたスキャッタグラムやヒストグラムなどが出力部14に出力される。

#### 【0033】

以下、血液と担体粒子を含む試料から前方散乱光強度と側方蛍光強度を検出し、それら光学的情報を解析することにより、血球計数測定と免疫測定（全血中のHBs抗原の検出）を行う実験につき説明する。

#### 【0034】

実験に用いる検体は、ヒト正常全血にHBs抗原を7段階の濃度別に添加したものを調製して検体①～⑦とした。検体①～⑦の各HBs抗原濃度は、①0U/mL、②1U/mL、③3U/mL、④9U/mL、⑤27U/mL、⑥81U/mL、⑦243U/mL、である。

#### 【0035】

測定には図1に示す本発明の血液分析装置を用いた。血液分析装置1は前述の通り試料調製部11、光検出部12、解析部13、出力部14からなる。試料調製部11は検体供給部11a、ラテックス試薬供給部11b、緩衝液供給部11c、希釈液供給部11d、染色液供給部11e、第一反応槽11f、第二反応槽11gからなる。

#### 【0036】

血液分析装置1の操作者は、装置を動作させるに先立ち、ラテックス試薬供給

部11bに以下の通り調製されたラテックス試薬をセットする。ラテックス試薬とは、免疫測定対象物質と特異的に抗原抗体反応する抗体又は抗原（ここでは抗HBs抗体）を表面に感作したラテックス粒子を含む試薬であり、このラテックス粒子が担体粒子として作用する。

調製方法：担体粒子には粒子径0.78 $\mu$ mで粒子表面がスルフェートのラテックス粒子に赤色蛍光色素（波長633nmのレーザ光で励起可能）を1%（w/v）含有させた蛍光ラテックス粒子を用いた。抗HBs抗体の感作は、まず抗HBs抗体（マウスモノクローナル抗体、市販品）60 $\mu$ gを含むGTA緩衝液（0.53mg/mL 3,3-ジメチルグルタル酸、0.4mg/mL トリス、0.35mg/mL 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、pH4.6）950 $\mu$ lに、蛍光ラテックス粒子10%（w/v）懸濁液50 $\mu$ lを加え、20℃で2時間静置した。これを10000×g、10分間遠心し、上清を捨て、沈殿に1%（w/v）牛血清アルブミン（市販品）を含むGTA緩衝液を1mL加えて、超音波処理し、分散させた。この遠心から分散までの工程を数回繰り返し、最後に遠心して上清を捨て、沈殿に220mg/mL グリセリン、0.3%（w/v）牛血清アルブミンを含むGTA緩衝液（pH6.2）1mLを加えて、超音波処理し、分散させた。これをラテックス試薬とした。

### 【0037】

また血液分析装置1の操作者は、装置を動作させるに先立ち、緩衝液供給部11cに以下の通り調製された反応緩衝液をセットする。

調製方法：1.6mg/mL 3,3-ジメチルグルタル酸、1.1mg/mL 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、18.18mg/mL トリス、5%（w/v）牛血清アルブミン、0.8%（w/v）デキストラン（市販品）、pH6.70を調製し、検体へ添加して測定用試料とするための反応緩衝液とした。

### 【0038】

また血液分析装置1の操作者は、装置を動作させるに先立ち、希釀液供給部11dにレットサーチ（II）希釀液（システムックス株式会社製）をセットする。これは後述する染色液による血球の染色処理に際して、試料を希釀するためのものである。

### 【0039】

また血液分析装置1の操作者は、装置を動作させるに先立ち、染色液供給部11eにレットサーチ（II）染色液（シスメックス株式会社製）をセットする。レットサーチ（II）染色液には、血球中の核酸を染色し波長633nmのレーザ光で励起可能なポリメチン系蛍光色素が含まれている。この色素により、血球中の核酸が蛍光染色される。

#### 【0040】

血液分析装置1の操作者は、検体を検体供給部11aにセットし、血液分析装置1を動作させると、まず検体供給部11aが検体20μLを定量し第一反応槽11fへ送液する。次に緩衝液供給部11cが反応緩衝液160μLを第一反応槽11fへ送液し、第一反応槽11fで検体と反応緩衝液が15秒間混和される。その後、ラテックス試薬供給部11bがラテックス試薬20μLを第一反応槽11fへ送液し、第一反応槽11f内で検体・反応緩衝液・ラテックス試薬が混和され、45℃で15分間インキュベーションされて、ラテックス試薬混合試料となる。この後、ラテックス試薬混合試料4.5μLが、第一反応槽11fから第二反応槽11gに送液される。また希釈液供給部11dがレットサーチ（II）希釈液0.8955mLを第二反応槽11gに送液し、第二反応槽11g内でラテックス試薬混合試料が希釈される。そして染色液供給部11eがレットサーチ（II）染色液18μLを第二反応槽11gに送液し、第二反応槽11g内で約31秒間染色反応が行われ、測定用試料が調製される。

#### 【0041】

このようにして調製された測定用試料2.8μLは光検出部12に送液され、試料中に含まれる各粒子から光学的情報として前方散乱光及び側方蛍光が得られる。図5に光検出部12の詳細な構成を示す。蛍光染色等の前処理が施された測定用試料をフローセル41（図1の12aに対応）に流して試料流を形成する。そしてフローセル41中の試料流に対して半導体レーザ光源42（図1の12bに対応）から照射されたレーザ光はコリメートレンズ43を介してフローセル41へ到達し、試料流を照射する。試料流中の粒子がレーザ光を横切る際に生じる前方散乱光は、集光レンズ44aとピンホール45aを介してフォトダイオード46（図1の12dに対応）に入射する。側方蛍光は集光レンズ44bとフィルタ4

9とピンホール45bを介してフォトマルチプライヤチューブ48（図1の12cに対応）に入射する。フォトダイオード46で光電変換されて出力される前方散乱光信号、フォトマルチプライヤチューブ48で光電変換されて出力される側方蛍光信号は、解析部13へ送られる。

#### 【0042】

解析部13では、光検出部12により検出した前方散乱光信号及び側方蛍光信号から粒子毎の前方散乱光強度及び側方蛍光強度を得て、それらをパラメータとしたスキャッタグラムを作成する。図6は検体⑥を測定して得られたスキャッタグラムであり、縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとったものである。血小板・赤血球及び担体粒子は、前方散乱光強度及び側方蛍光強度の違いによりそれぞれの集団を形成している。図6のスキャッタグラムには予め、担体粒子が出現すると目される領域G5が設定されている。同様に、血小板が出現すると目される領域G6、赤血球が出現すると目される領域G7が、それぞれ設定されている。この領域の設定は、通常の赤血球よりも蛍光強度の大きな網状赤血球の出現を考慮したものであり、赤血球の出現領域G7は成熟した赤血球の出現位置よりも蛍光強度の大きな位置、つまり網状赤血球の出現領域を含むようにしてある。

#### 【0043】

図6において、領域G5内に担体粒子が単独粒子、二個凝集粒子、三個凝集粒子に分かれて出現していることがわかる。解析部13は、領域G5内に出現した粒子の粒度分布を示すヒストグラムを作成する。図7は、領域G5内に出現した粒子の粒度分布を示すヒストグラムであり、縦軸に度数（粒子数）を、横軸に前方散乱光強度をとったものである。解析部13は、領域G5内の粒度分布に基づき、単独粒子数Mと凝集粒子数P（二個以上凝集している粒子数の合計）から総粒子数Tを得て、凝集率（P/T%）を求める。前記①～⑦の各検体を測定して得られた担体粒子の凝集率を表1に示す。

## 【0044】

【表1】

検体	凝集率 (P/T%)
①	0.37
②	0.78
③	1.80
④	4.91
⑤	13.46
⑥	29.68
⑦	45.31

## 【0045】

上記表1より、検体中に含まれる抗HBs抗体の濃度に依存して凝集率が変化していることがわかる。よって、既知濃度の免疫測定対象物質を含む検体を測定して予め作成した検量線に基づき、凝集率を濃度換算することで、検体中に含まれる免疫測定対象物質の濃度を得ることができる。

## 【0046】

図8は本血液分析装置において、検体として前記検体①と同じヒト正常全血を用い、前記試料調製部11での試料調製工程においてラテックス試薬を添加せずに測定用試料を調製したものを測定して得たスキャッタグラムである。縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとっている。測定用試料中にラテックス試薬が含まれていないので、図6と比べると図8のスキャッタグラム上には担体粒子が現れないが、血小板・赤血球とも出現位置に変わりは無い。すなわち、ラテックス試薬の有無は血球計数測定の結果に影響を与えないことがわかる。

## 【0047】

前述の通り図6のスキャッタグラム上には、血小板・赤血球の各血球が出現すると目される領域G6・G7をそれぞれ設定しておき、各領域内に出現した粒子数が計数される。なお各種血球のうち白血球は、血小板や赤血球よりも前方散乱

光強度や蛍光強度が大きく、図6や図8に示したスキャッタグラムでは表示されない位置に出現してしまう。そこで、解析部13は、より大きな前方散乱光強度や側方蛍光強度を反映し、白血球と他の粒子との分類が可能となるスキャッタグラムを作成する。そして白血球が出現すると目される領域を設定してエリア内の粒子数を計数する。図9に白血球を分類計数するためのスキャッタグラムを示す。図6や図8と同様、縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとったものであるが、各パラメータの表示範囲をより大きくとっていることにより白血球の出現が明確となる。一方、図6や図8のスキャッタグラムでは明確に分かれて出現していた血小板、赤血球、担体粒子の各集団は、図9のスキャッタグラム上では左下方部に固まって出現し、明確に分かれて表示されない。領域G8は、白血球が出現すると目される領域であり、この領域内に出現した粒子が白血球として計数の対象となる。

#### 【0048】

解析部13は、スキャッタグラム上の領域G6・G7・G8内に出現した粒子をそれぞれ計数し、血小板数・赤血球数・白血球数とする。また赤血球として計数された各粒子の容積を前方散乱光強度に基づいて算出してそれらを合計する。そして合計した値を粒子数で除算することによりMCV（平均赤血球容積）を算出する。

#### 【0049】

本発明の血液分析装置により検体⑥を測定し、図6及び図9に示すスキャッタグラムに基づき各種血球の分類計数を行った結果と、検体⑥と同じ全血検体を従来法によって測定した結果を比較した。従来法は、全血検体のセットから解析に至る測定の全工程を自動血球分析装置XE-2100（シスメックス株式会社製）の通常の測定方法に従って行ったものである。XE-2100は、光学式の検出系以外にいわゆる電気抵抗式の検出器を有しており、血小板数、赤血球数、MCV（平均赤血球容積）は、電気抵抗式の検出器により検出された結果に基づき算出される。白血球数は、光学式の検出系により検出された結果に基づき算出される。

#### 【0050】

下記表2に、本発明の血液分析装置による測定結果と、従来法による測定結果

とを示す。

### 【0051】

【表2】

	本発明	従来法
赤血球	4.70 (10 <sup>6</sup> 個/μL)	4.60 (10 <sup>6</sup> 個/μL)
血小板	301 (10 <sup>3</sup> 個/μL)	302 (10 <sup>3</sup> 個/μL)
白血球	12.10 (10 <sup>3</sup> 個/μL)	12.17 (10 <sup>3</sup> 個/μL)
MCV	95.8 (fL)	95.8 (fL)

### 【0052】

上記表2にから明らかな通り、各項目につき、本発明による血球計数結果は従来法との間で良い相関が得られている。

### 【0053】

解析部13は、全血試料を対象とした免疫測定の結果に、ヘマトクリット補正を行う機能を有する。以下、ヘマトクリット補正について説明する。免疫測定において、免疫測定対象物質の抗原や抗体が血清・血漿中にのみ存在する場合は、全血中に占める血球成分の容積比率（ヘマトクリット値）の違いにより、全血で免疫測定を行った場合と血清（又は血漿）に対する測定を行った場合とで、含まれる免疫測定対象物質の濃度に違いが生じる。ヘマトクリット値には個体差があるので、全血免疫測定の結果に一定の係数をかける方法では、血清や血漿を用いて測定した場合の測定値に正確に補正することは困難である。そこで、全血免疫測定の結果を、血球計数測定から得られたヘマトクリット値を用いて血清や血漿を用いて測定した場合の測定値に補正する、いわゆるヘマトクリット補正を用いれば、血清（又は血漿）に対して行った測定と同様の測定値が得られる。

### 【0054】

ヘマトクリット値は全血中に占める血球成分の容積比率であるが、血球成分の大部分を占める赤血球容積比率をヘマトクリット値として用いる例を以下に述べる。本分析装置では前記の通り、赤血球として計数された各粒子の容積を前方散

乱光信号に基づき算出する。そして各粒子の容積を合計し、粒子数で除算することによりMCVを算出している。解析部13ではさらにこのMCVに粒子数を乗ずることによりヘマトクリット値を算出する。ここで全血中の免疫測定対象物質の濃度をA、血清（又は血漿）中の免疫測定対象物質の濃度をB、ヘマトクリット値（%）をCとすると、血清（又は血漿）中の免疫測定対象物質の濃度Bは以下の式

$$B = A \times 100 / (100 - C)$$

によって求められる。解析部13ではこの式を用い、全血に対する免疫測定の結果に対して血球計数測定で求めたヘマトクリット値を用いた補正を行うことにより、全血中における免疫測定対象物質の濃度が血清（又は血漿）中における免疫測定対象物質の濃度に換算される。

#### 【0055】

解析部13にて算出された免疫測定の結果やヘマトクリット補正の結果、各種血球数、解析の際に作成されたスキャッタグラム、ヒストグラムは出力部14に出力される。

#### 【0056】

##### 別実施形態例

図10は、本発明の別の一実施形態例にかかる血液分析装置を示すものである。この例は、図1に示した血液分析装置1の試料調製部11を、免疫測定用の試料と、血球計数測定用の試料を別々に調製するような構成としたものである。なお、図1と共通する構成については同じ符号を用いている。

#### 【0057】

以下、図10に示した血液分析装置1の構成及び動作につき説明する。試料調製部11は検体供給部11a、ラテックス試薬供給部11b、緩衝液供給部11c、希釀液供給部11d、染色液供給部11e、第一反応槽11f、第二反応槽11gからなる。血液分析装置1を動作させるに先立ち、操作者は検体を検体供給部11aに、反応緩衝液を緩衝液供給部11cに、希釀液を希釀液供給部11dに、染色液を染色液供給部11eにセットする。検体、ラテックス試薬、反応緩衝液、希釀液、染色液には、上記に説明してきた血液分析装置と同様のものを

用いる。

#### 【0058】

血液分析装置1の動作が開始されると、まず検体供給部11aは検体20 $\mu$ Lを定量して第一反応槽11fへ送液する。次に緩衝液供給部11cが反応緩衝液160 $\mu$ Lを第一反応槽11fへ送液し、第一反応槽11f内で検体と反応緩衝液が15秒間混和される。その後、ラテックス試薬供給部11bがラテックス試薬20 $\mu$ Lを第一反応槽11fへ送液し、第一反応槽11f内で検体・反応緩衝液・ラテックス試薬が混和され、45°Cで15分間インキュベーションされて、免疫測定用試料となる。

#### 【0059】

この後、検体供給部11aは検体20 $\mu$ Lを定量して第二反応槽11gへ送液する。希釈液供給部11dはレットサーチ（II）希釈液0.8955mLを第二反応槽11gに送液し、検体を希釈する。次に染色液供給部11eが、レットサーチ（II）染色液18 $\mu$ Lを第二反応槽11gに送液し、約31秒間染色反応を行い、血球計数測定用試料を調製する。

#### 【0060】

その後、第一反応槽11f内の免疫測定用試料が光検出部12のフローセル12aへ送液され、試料中の各粒子から側方蛍光信号及び前方散乱光信号が検出される。次に、第二反応槽11g内の血球計数測定用試料が光検出部12のフローセル12aへ送液され、試料中の各粒子から側方蛍光信号及び前方散乱光信号が検出される。検出された各信号は、解析部13へ送られる。すなわち、免疫測定用試料・血球計数測定用試料は、それぞれ同じフローセルに流され、光学的情報の検出が行われる。光検出部12の詳細な構成及び動作は、前記図5を用いて説明した血液分析装置1の場合と同様である。

#### 【0061】

解析部13は、免疫測定用試料から検出された側方蛍光信号及び前方散乱光信号に基づき、スキャッタグラムを作成する。図11にスキャッタグラムの例を示す。担体粒子は領域G5内に出現している。この免疫測定用試料には、血球を蛍光染色するための染色液が添加されていないため、試料中に含まれる粒子のうち

担体粒子のみが強い蛍光強度を有する。そのため、試料中に含まれる粒子から担体粒子を分類する際のS/N比が向上する。担体粒子の分類及び凝集率の算出は、前記図1に記載の血液分析装置と同様に行われる。そして検量線に基づき濃度換算することで免疫測定対象物質の濃度を得る。

#### 【0062】

また解析部13は、血球計数測定用試料から検出された側方蛍光信号及び前方散乱光信号に基づき、スキャッタグラムを作成する。図12・図13に、血球計数測定用試料から得られたスキャッタグラムの例を示す。図12は前記図6に、図13は図9に対応する。この血球計数測定用試料には、免疫測定用の担体粒子が添加されていないため、スキャッタグラム上には血球のみが出現する。そして前記図1に記載の血液分析装置と同様に、スキャッタグラム上に予め設定された領域（G6、G7、G8）に基づき、血球を血小板、赤血球、白血球に分類し、それぞれを計数する。

#### 【0063】

解析部13による免疫測定結果、血球計数測定結果は、出力部14に出力される。なお、以上に説明した別実施形態例においても、図1に示した血液分析装置と同じく血球計数測定の結果に基づきヘマトクリット値を算出し、そのヘマトクリット値に基づき免疫測定結果を補正してもよい。

#### 【0064】

上記別実施形態例のように、免疫測定用の試料と、血球計数測定用の試料を別々に調製し、光検出部12における光学的情報の検出を別々に行うようにしても、光検出部12を、免疫測定・血球計数測定に共通して利用することができる。

#### 【0065】

なお、上記に示してきた本発明の各実施形態において、血球計数測定及び免疫測定を行うために試料から検出する光学的情報としては、前方散乱光と側方蛍光を用いた。しかし光学的情報はそれらに必ずしも限られることはなく、側方散乱光、吸光度、燐光、化学発光、生物発光など各種光学的情報のうち、血球及び担体粒子から共通して得られるものを適宜選択すればよい。また用いる光学的情報に応じ、担体粒子には各種色素、発光基質等が適宜含有されるようにしておくこ

とができる。

### 【0066】

あるいは、光学的情報以外で、粒子の特徴を反映するような物理的特性を各粒子から検出し、その物理的特性に基づき各粒子の分類を行ってもよい。例えば、細孔を挟むように電極を配置したものを検出器として用い、各電極間に電圧を印加した状態で、測定対象の粒子を細孔に通過させる。粒子が細孔を通過する際に、粒子の大きさに比例して電気抵抗が生じるので、この電気抵抗の大きさを各粒子が有する物理的特性として検出することができる。このように電気抵抗を利用して粒子を計測するための検出器としては、例えば米国特許5905214号明細書に開示されたものを用いることができる。各粒子から検出した電気抵抗の大きさに基づいて粒子の分類を行う場合には、血球と担体粒子とを判別できるよう、担体粒子の粒径や電気抵抗特性を調整することが好ましい。

### 【0067】

#### 【発明の効果】

本発明により、血球計数測定と免疫測定を同一の測定部（上記に説明した実施形態においては光検出部）を用いて行うことが可能となる。また、複数の測定項目にわたり検体・試薬の共通化を図ることができる。また免疫測定において検体の遠心分離を要さない全血測定を可能とし、検体採取から検査結果を得るまでの時間を短縮できる。免疫測定の結果に対して行うヘマトクリット補正を、同一の血液試料から得られた血球計数測定に基づき行うことができるので、より正確なヘマトクリット補正ができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本発明の一実施形態である血液分析装置の構成を説明する模式図である。

##### 【図2】

スキャッタグラム上で担体粒子と血球とが異なる位置に出現した様子を説明する図である。

##### 【図3】

スキャッタグラムにおける担体粒子の領域内に出現した粒子のヒストグラムを

説明する図である。

【図4】

スキャッタグラム上で第一の担体粒子、第二の担体粒子、及び血球が異なる位置に出現した様子を説明する図である。

【図5】

血液分析装置の光検出部を説明する図である。

【図6】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【図7】

スキャッタグラム上の、担体粒子の領域内に出現した粒子の粒度分布を表わすヒストグラムを示す図である。

【図8】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【図9】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【図10】

本発明の別の一実施形態にかかる血液分析装置を示す図である。

【図11】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【図12】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【図13】

スキャッタグラムの一例を示す図である。

【符号の説明】

1 血液分析装置

1 1 試料調製部

1 2 光検出部

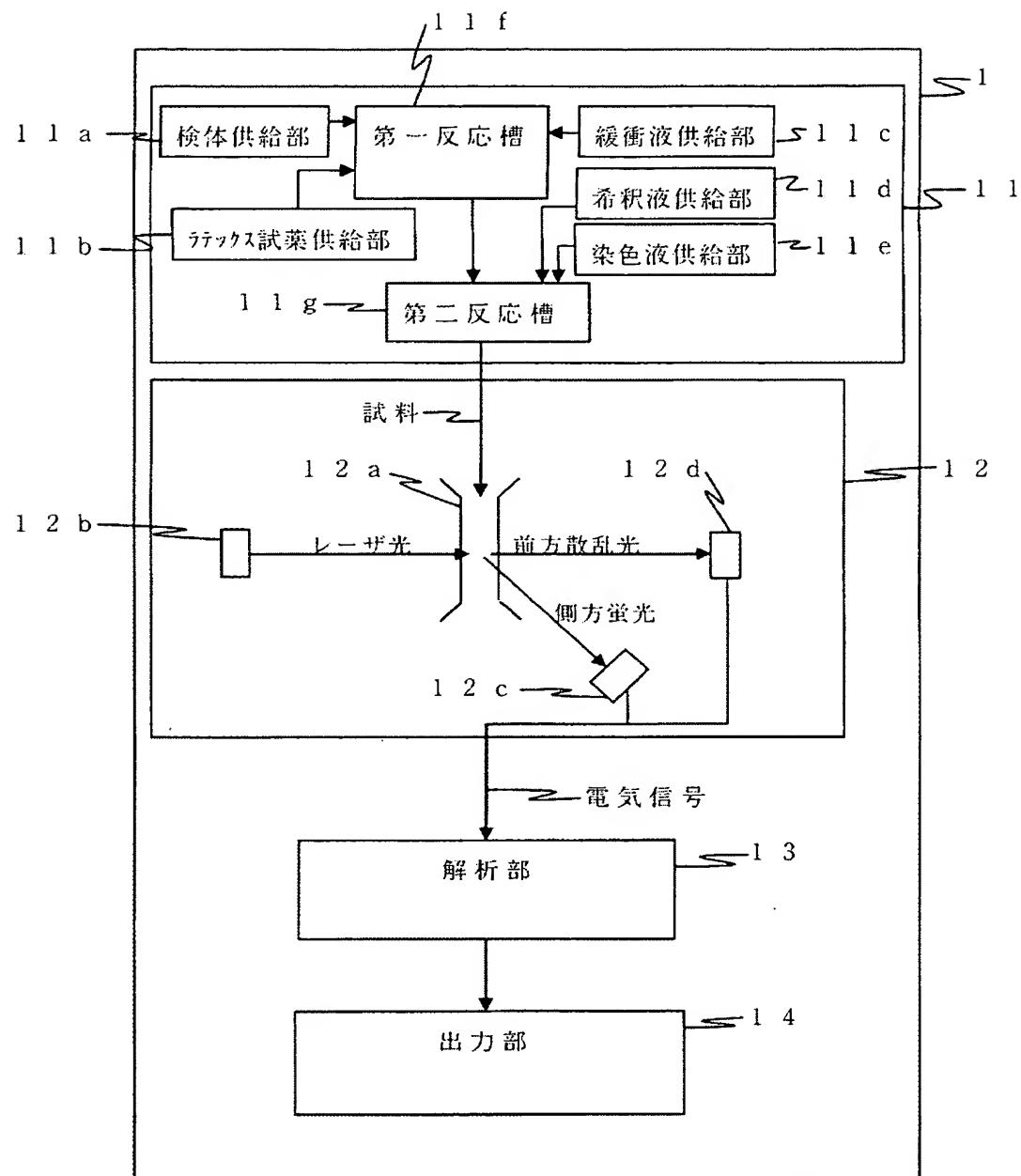
1 3 解析部

1 4 出力部

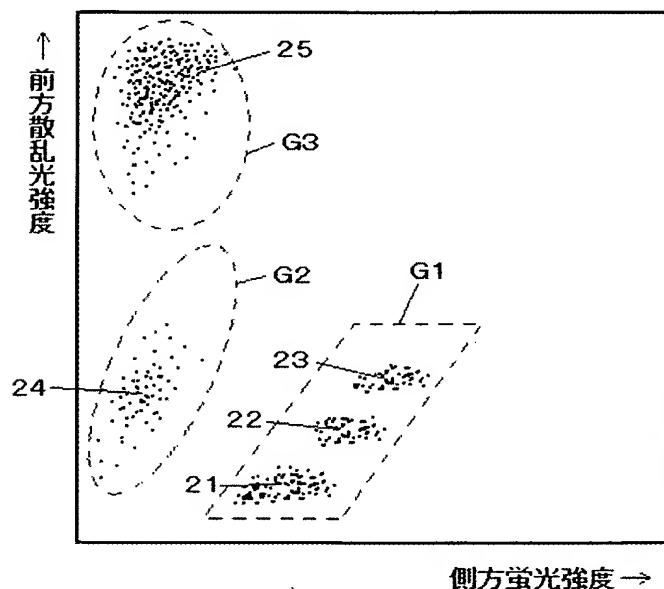
- 2 1 担体粒子の単独粒子
- 2 2 担体粒子の二個凝集粒子
- 2 3 担体粒子の三個凝集粒子
- 2 4 血小板
- 2 5 赤血球
- G 1 担体粒子が出現する領域
- G 2 血小板が出現する領域
- G 3 赤血球が出現する領域

【書類名】 図面

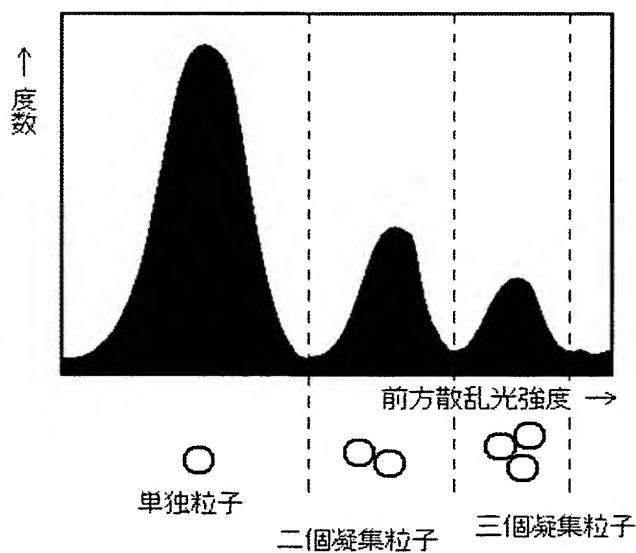
【図1】



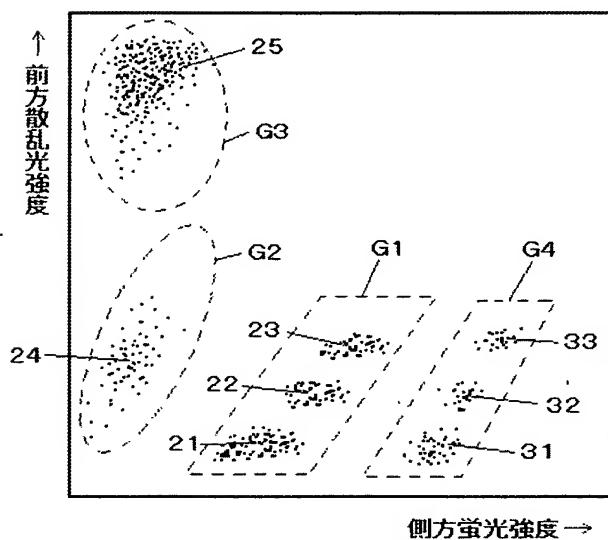
【図 2】



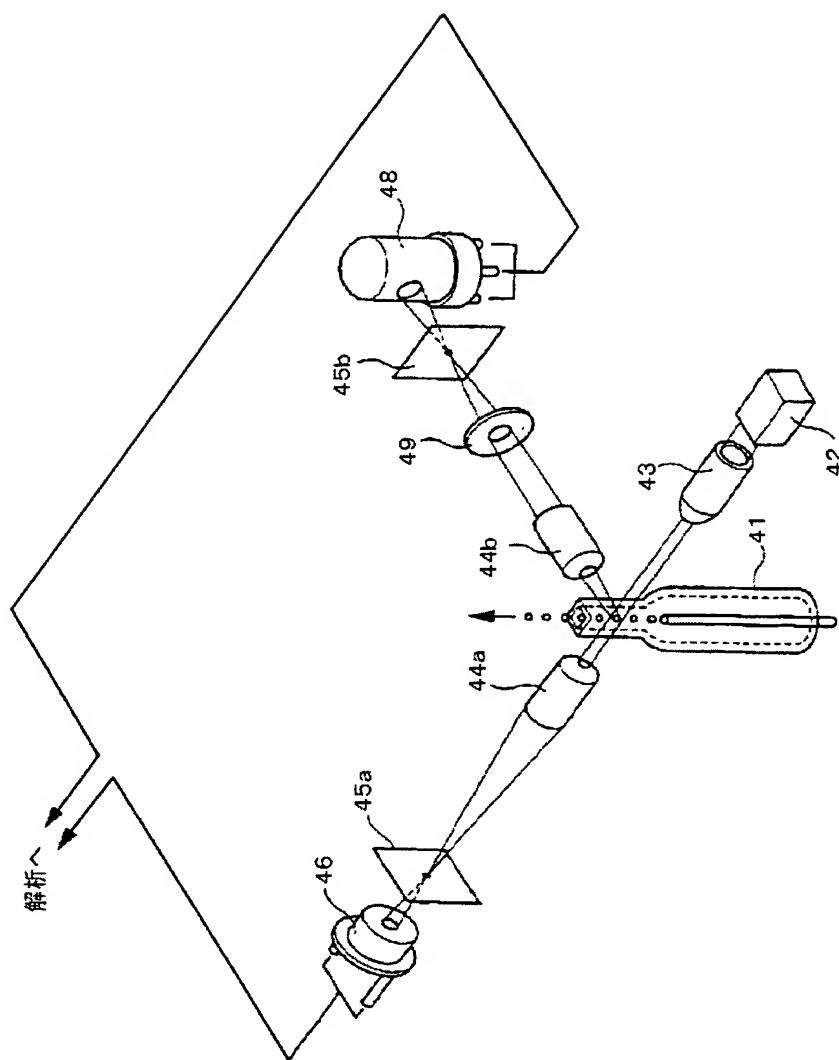
【図 3】



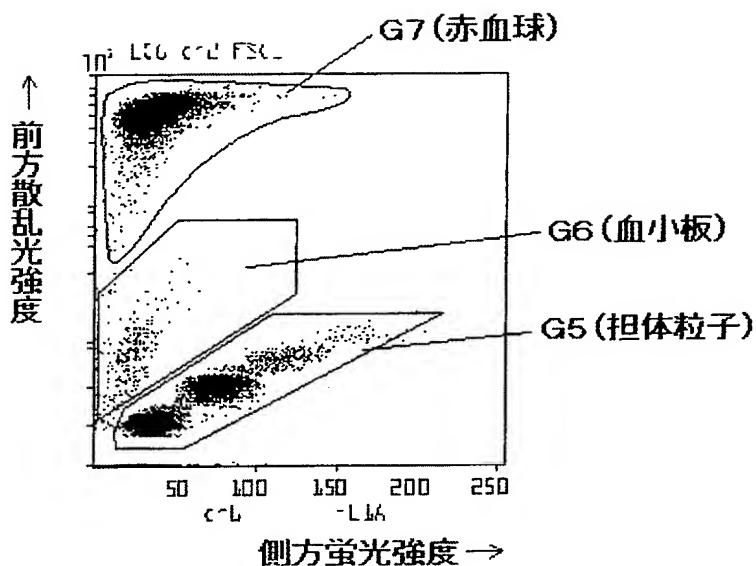
【図4】



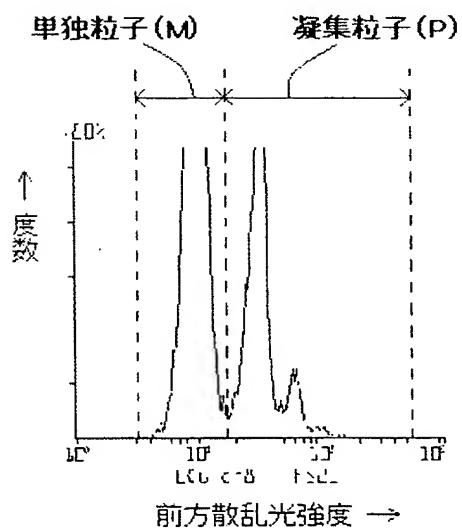
【図 5】



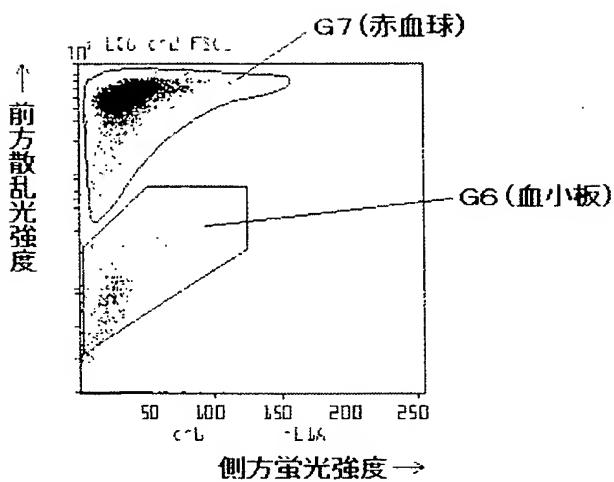
【図6】



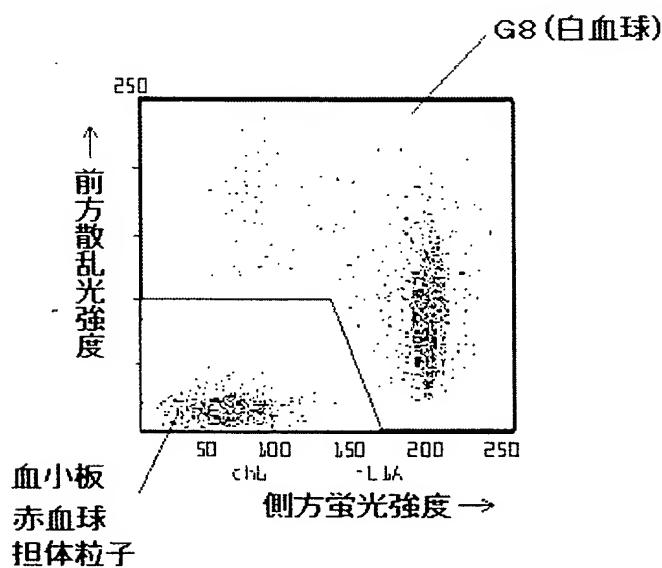
【図7】



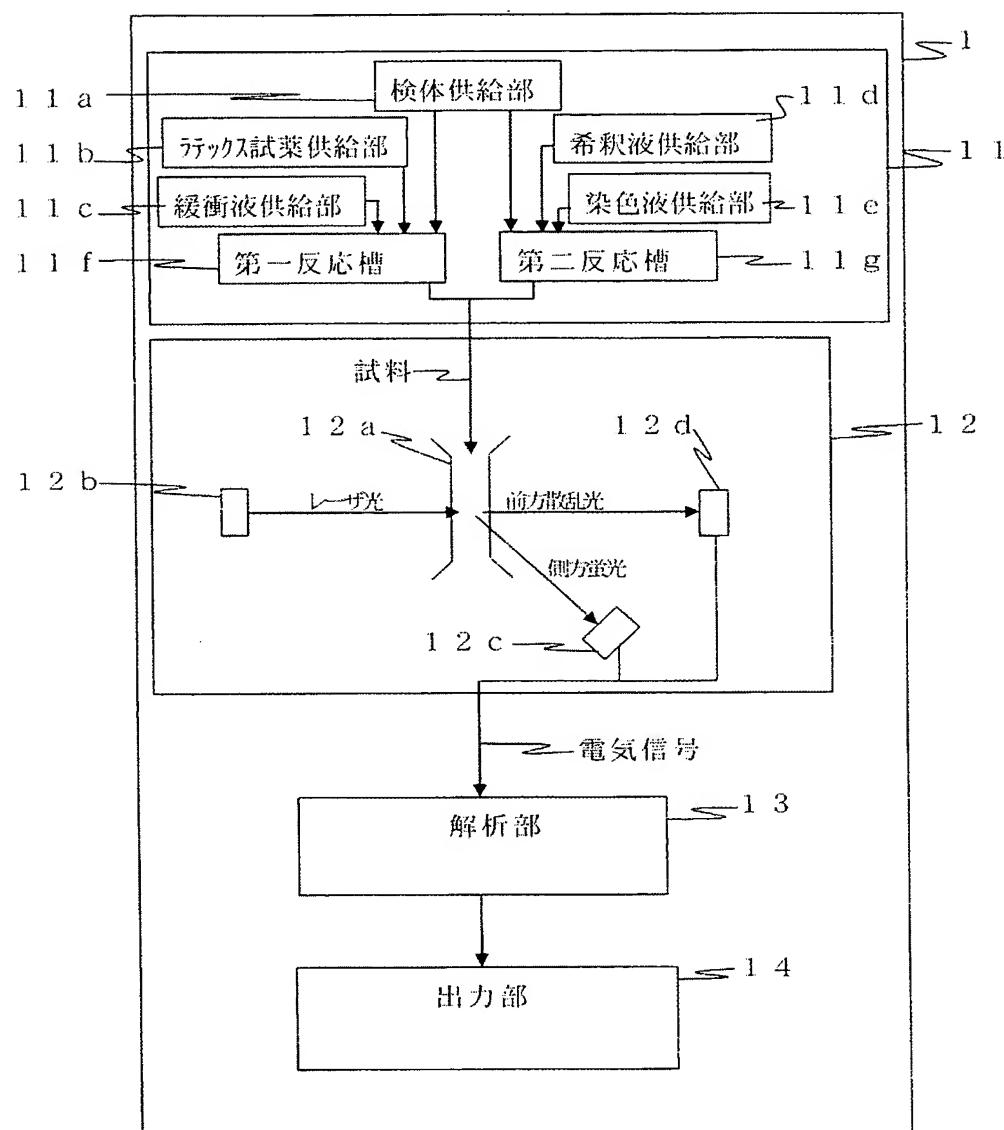
【図 8】



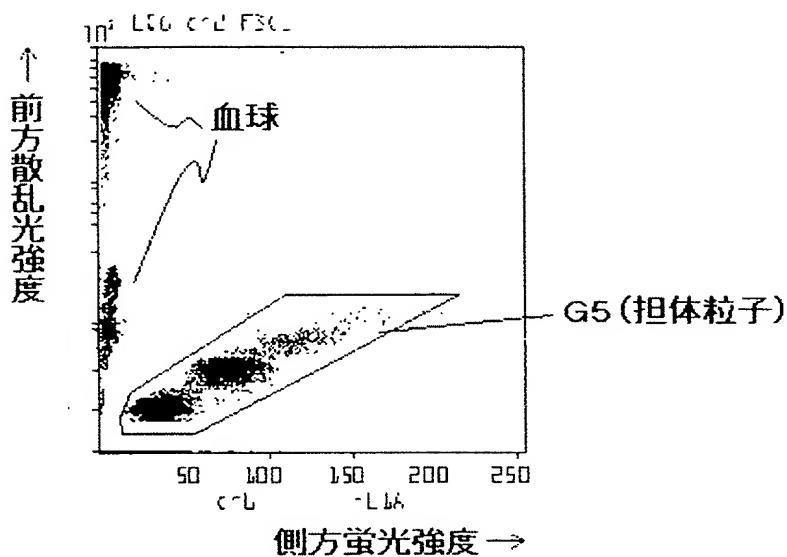
【図 9】



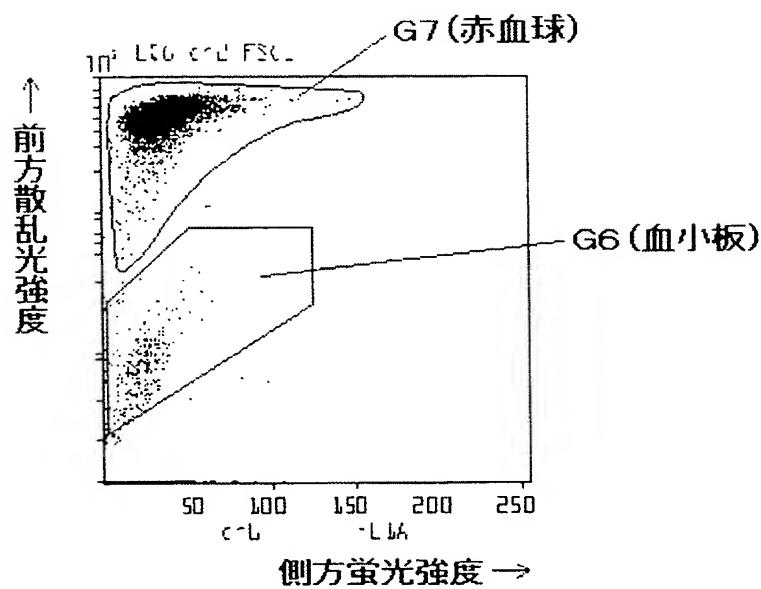
【図10】



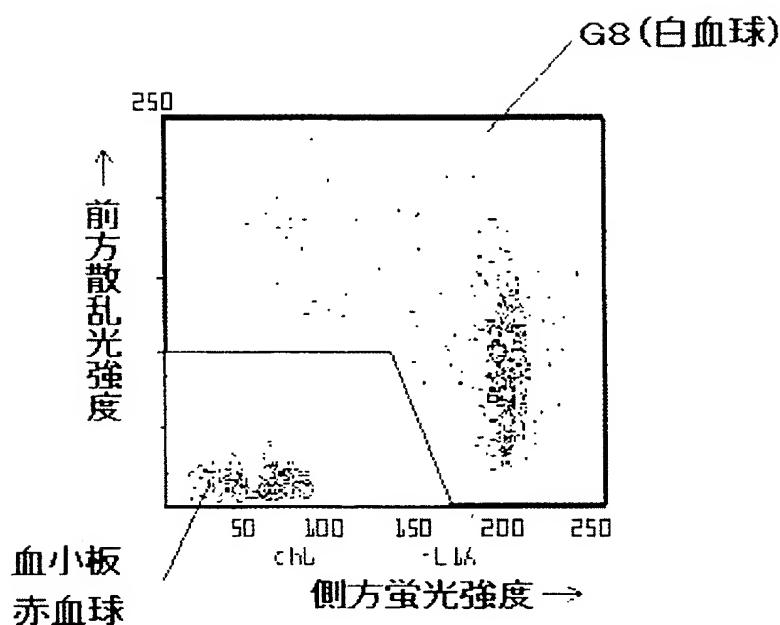
【図11】



【図12】



【図13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 全血検体に対し、一つの測定部で血球計数測定と免疫測定を行う。

【解決手段】 本発明では、全血検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する。測定用試料中の粒子から光学的情報を検出し、検出された光学的情報に基づき血球を分類して計数する。また検出された光学的情報に基づき担体粒子の凝集度を求めて免疫測定対象物質を検出する。

【選択図】 図2

特願2003-188895

出願人履歴情報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日  
[変更理由] 名称変更  
住所変更  
住 所 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
氏 名 シスメックス株式会社